

cited in the European Search
Report of EP 38 95 6185.7
Your Ref.: 1220-1EP

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 641 793**
(à utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **88 17185**

⑤① Int Cl⁹ : C 12 N 15/75.

①② **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②② Date de dépôt : 26 décembre 1988.

③① Priorité :

⑦① Demandeur(s) : SETRATECH, S.A.R.L. — FR.

⑦② Inventeur(s) : Miroslav Radman ; Christiane Rayssiguier.

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 29 du 20 juillet 1990.

⑥① Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : Cabinet Regimbeau, Martin, Schrimpf,
Warcoïn et Ahner.

⑤④ Procédé de recombinaison *in vivo* de séquences d'ADN présentant des mésappariements de bases.

⑤⑦ La présente invention concerne un procédé de recombinaison *in vivo* de séquences d'ADN partiellement homologues présentant jusqu'à 30 % de mésappariements de bases. Selon sa caractéristique essentielle, on met en présence lesdites séquences dans des cellules ou un organisme dont le système enzymatique de réparation des mésappariements est déficient ou a été inactivé transitoirement par saturation le temps d'obtenir la recombinaison entre lesdites séquences d'ADN.

FR 2 641 793 - A1

La présente invention concerne un procédé de recombinaison in vivo de séquences d'ADN homologues mais présentant une proportion importante de mésappariements de bases pouvant aller notamment jusqu'à 30 %.

Il est ainsi possible de recombiner des gènes individuels, au niveau de cellules ou d'organismes d'espèces et genres différents ayant partagé les mêmes ancêtres.

La présente invention concerne également un procédé de production d'organismes recombinés par croisement et recombinaison in vivo d'organismes d'espèces et/ou de genres différents, ainsi qu'un procédé de production in vivo de gènes hybrides et donc des protéines hybrides codées par ceux-ci.

Lors de la synthèse de l'ADN, des erreurs peuvent se produire et conduire à des paires de bases non complémentaires appelées mésappariements. Il existe un processus de correction des erreurs (mésappariements et non appariements des bases) dans le DNA. Ce processus fait intervenir un système enzymatique. Ainsi, chez les bactéries Escherichia Coli et Salmonella typhimurium, les erreurs sont très rapidement et précisément détectées par deux enzymes (MutS et MutL) permettant à une troisième enzyme (MutU) de dérouler les deux brins d'ADN et à une quatrième enzyme (MutH) de couper le brin néosynthétisé sur une séquence du DNA (GATC) elle-même méthylée plus tard par une autre enzyme (réf. : 1). Les erreurs les plus fréquentes G:T, A:C et plus ou moins une base, sont les plus efficacement réparées. Les erreurs pas ou mal détectées par les enzymes Mut (G:A, C:T et C:C dans certains endroits) ont une structure particulière "ouvrant" les deux brins.

Jusqu'à maintenant, l'obtention d'espèces hybrides ou de gènes hybrides se heurtait à de nombreux problèmes. Pour ce qui est d'espèces hybrides, les tentatives les plus avancées faites in vitro dans le domaine végétal par fusion de cellules se heurtaient au problème majeur de l'instabilité génétique. Quant à l'obtention de gènes ou enzymes hybrides, elle était possible uniquement in vitro par génie génétique.

Le but de la présente invention est de faire de nouvelles espèces hybrides ou, à fortiori, de nouveaux gènes ou enzymes hybrides par recombinaisons intergénériques et/ou interspécifiques in vivo avec une efficacité et une facilité accrue.

Pour ce faire, et selon une première variante de l'invention, on utilise des mutants défectueux dans le système de réparation des mésappariements de bases de l'ADN.

On peut citer notamment les souches mut de Escherichia coli et Salmonella thyphimurium ou encore les souches hex de Streptococcus pneumoniae (réf. : 2) et pms chez la levure (réf. : 3)

En effet, on a découvert selon l'invention que le mécanisme moléculaire de la spéciation, et donc de l'apparition d'une nouvelle espèce, peut impliquer de façon critique l'activité des enzymes de correction des mésappariements et seulement elles. L'invention consiste en effet à exploiter le rôle d'"antirecombinaison" stimulé par les mésappariements de bases d'ADN qu'ont les enzymes de réparation de ces mésappariements. Ce rôle définit un mécanisme moléculaire de la spéciation, c'est-à-dire de la séparation génétique initiale de nouvelles espèces.

Toutefois, au lieu de l'utilisation des mutants défectueux dans le système enzymatique de réparation des mésappariements de bases de l'ADN, on peut inactiver transitoirement ce système le temps d'obtenir les recombines voulus, notamment par saturation.

Compte tenu du fait que les mutants de réparation des mésappariements sont génétiquement instables, il peut être intéressant d'utiliser une déficience transitoire nécessaire à la construction génétique désirée avant de revenir à la stabilité génétique normale. Le problème principal en biotechnologie classique est l'instabilité génétique des souches "industrielles". Après la sélection du variant voulu, sa propre stabilité génétique est compromise et il reverse vers le type sauvage au cours de la croissance dans le fermenteur.

La stratégie pour l'inactivation transitoire du système de correction des mésappariements selon l'invention est double :

a) Utilisation d'un mutant de correction conditionnel ($\text{mutS}^{\text{ts-1}}$) d'Escherichia coli pour toute construction génétique chez E. coli, et

b) Saturation, c'est-à-dire inactivation fonctionnelle du système de correction par l'introduction dans la cellule d'un grand nombre de mésappariements. Cette méthode est applicable à n'importe quel organisme.

5 La présente invention a donc pour objet un procédé de recombinaison in vivo de séquences d'ADN homologues mais présentant des mésappariements de bases, caractérisé en ce qu'on met en présence lesdites séquences dans des cellules ou un organisme dont le système enzymatique de réparation des mésappariements de bases est défectueux ou a été
10 inactivé transitoirement par saturation le temps d'obtenir la recombinaison entre lesdites séquences d'ADN.

Il convient donc le cas échéant que l'une au moins des enzymes soit inactivée, à savoir une enzyme impliquée dans la reconnaissance ou dans la correction proprement dite des erreurs.

15 Les séquences d'ADN en cause à recombinaison peuvent être chromosomiques ou extra-chromosomiques permettant dans ce dernier cas la recombinaison entre des gènes individuels clonés.

Comme application de ce procédé de recombinaison in vivo, la présente invention a également pour objet un procédé de production in vivo
20 de gènes hybrides et de leur protéines codées, caractérisé en ce qu'on met en présence dans ledit organisme défectueux ou inactivé dans le système enzymatique de réparation des mésappariements de bases, deux dites séquences d'ADN consistant en des gènes partiellement homologues issus de deux organismes différents, et on sélectionne le gène hybride recherché ou
25 sa protéine codée. Il s'agit dans ce cas de production in vivo extra-chromosomique.

On pourra introduire par exemple sur des plasmides les deux gènes homologues codant pour une même fonction mais ayant une séquence différente et des propriétés enzymatiques du produit bien différentes puis
30 sélectionner sur boîte de Pétri parmi les milliers de différentes recombinaisons obtenues celles qui pourraient nous intéresser. Ceci correspondrait autrement à un travail immense du génie génétique in vitro.

Avantageusement, pour toute construction chez E. coli, on utilisera une souche thermosensible pour la fonction de réparation des mésappariements, par exemple la souche E. coli mutS^{ts-1} qui est mutatrice mutS⁺ à 42°C et normale mut⁺ à 32°C. On active la recombinaison hétérospécifique à 42°C, on sélectionne le caractère recherché à 32°C.

L'invention a pour objet en application du procédé de recombinaison in vivo selon l'invention un procédé de production de cellules recombinées par des techniques de transformation ou fusion, caractérisé en ce que :

- 10 - on effectue une transformation et une recombinaison in vivo :
 - . à l'aide de l'ADN de cellules d'un organisme d'une première espèce et/ou d'un premier genre,
 - . avec l'ADN chromosomique des cellules d'un organisme d'une deuxième espèce et/ou d'un deuxième genre,
- 15 ces cellules de l'organisme de deuxième espèce ou genre étant défectueuses dans les systèmes enzymatiques de réparation des mésappariements ou ayant ledit système inactivé transitoirement, notamment par saturation, ou bien
- 20 - on effectue la fusion in vivo des chromosomes de ces deux types de cellules, celles-ci ayant toutes deux un système enzymatique de réparation des mésappariements défectueux ou ayant ledit système inactivé transitoirement notamment par saturation.

- L'invention a également pour objet en application du procédé de recombinaison in vivo selon l'invention, un procédé de production d'organismes recombinés par croisement et recombinaison in vivo d'organismes d'espèces et/ou de genres différents, caractérisé en ce qu'on effectue un croisement et une recombinaison in vivo entre :
- un organisme d'une première espèce et/ou d'un premier genre, et
 - un organisme d'une deuxième espèce et/ou d'un deuxième genre,
- 30 l'un au moins de ces deux organismes étant défectueux dans le système enzymatique de réparation des mésappariements ou ayant ledit système inactivé transitoirement, notamment par saturation.

Dans le procédé de production de cellules ou d'organismes recombinés selon l'invention, on peut produire des cellules ou des organismes recombinés de bactéries, mais aussi de levures, de plantes ou même d'animaux.

En particulier, l'invention a pour objet un procédé de production de bactéries recombinées par croisement et recombinaison de bactéries d'espèces et/ou de genres différents, caractérisé en ce qu'on effectue une conjugaison in vivo entre

- 5 - des bactéries dites réceptrices d'une première espèce et/ou d'un premier genre qui sont défectueuses dans les systèmes enzymatiques de réparation des mésappariements de base ou dont les systèmes enzymatiques de réparation des mésappariements de bases sont inactivés transitoirement, notamment par saturation, et
- 10 - des bactéries dites donneuses, d'une deuxième espèce et/ou d'un deuxième genre qui comportent un caractère particulier que l'on souhaite transférer aux cellules réceptrices.

Avantageusement, les bactéries dites réceptrices sont en outre défectives dans les systèmes enzymatiques de restriction de l'ADN.

- 15 L'invention s'est traduite de façon spectaculaire dans le domaine de la conjugaison de bactéries. Les deux genres bactériens Escherichia coli et Salmonella thyphimurium qui se sont séparés génétiquement il y a 140 millions d'années (Ochman et Wilson 1987) ne se croisent pas du tout aujourd'hui par recombinaison du DNA.

- 20 Les croisements par conjugaison entre Salmonella thyphimurium et Escherichia coli sont en effet stériles, c'est-à-dire que la recombinaison est absente ou très faible selon le locus considéré (Baron et al. 1959 ; Einsenstark 1965, Mergeay et Gerits 1983). Toutefois, quand on élimine les fonctions MutL ou MutS par exemple, par mutations, de ces
- 25 souches on obtient de nouveau, après 140×10^6 années, un croisement par recombinaison très efficace (au moins 10^6 fois plus élevé que chez les bactéries non mutées). Ainsi le rôle des enzymes de réparation dans la stérilité interspécifique et intergénérique est attesté dans des croisements bactériens.

30

Dans un mode de réalisation particulier du procédé de production de bactéries recombinées selon l'invention, on croise une souche de E. Coli et une souche de Salmonella thyphimurium dont l'une au moins est défectueuse ou inactivée, notamment par saturation dans son système enzymatique de réparation des mésappariements de bases.

De préférence, on conjuguera une bactérie donneuse du type Hfr avec une bactérie réceptrice du type F⁻.

Dans un mode de réalisation particulier, on a réalisé selon l'invention la conjugaison entre une souche E. Coli donneuse Hfr et une souche Salmonella thyphimurium F⁻ mutante défective pour le système enzymatique de réparation des mésappariements de base du type mutS ou mutL, c'est-à-dire défective pour les protéines MutS et MutL qui interviennent dans la reconnaissance des mésappariements.

Le procédé de production des bactéries recombinées selon l'invention peut conduire à la fabrication de souches nouvelles, par exemple des souches de Salmonella pathogènes atténuées, rendues non toxiques par croisement avec des souches Escherichia coli mais portant toujours les déterminants antigéniques de surface des souches pathogènes, ceci pour produire le vaccin contre la Salmonellose correspondante.

En application du procédé de production d'organismes recombinés selon l'invention, un autre objet de la présente invention est un procédé de production in vivo de gènes hybrides et de leurs protéines codées, à partir de deux gènes partiellement homologues caractérisés en ce qu'on prépare des cellules recombinées à partir de cellules dudit premier organisme qui contiennent un premier gène et les cellules dudit deuxième organisme qui contiennent un second gène partiellement homologue, et on sélectionne le gène hybride recherché ou sa protéine codée.

On peut, en particulier, en utilisant les mutants de réparation des mésappariements de base, croiser des bactéries d'origines différentes et produire ainsi des gènes nouveaux et sélectionner les propriétés recherchées. Il s'agit dans ce cas de gènes chromosomiques.

Comme mentionné précédemment, l'utilisation de mutants en système enzymatique de réparation des mésappariements de base peut être remplacée par la saturation du système enzymatique en introduisant par transfection un hétéroduplex d'ADN riche en mésappariements.

5 La présente invention a enfin pour objet un procédé de mutagenèse inverse ciblée d'un gène dans un organisme ledit gène comportant une base mutée que l'on veut rétablir telle qu'avant sa mutation, caractérisé en ce qu'on introduit un hétéroduplex comportant un nombre élevé de mésappariements pour inactiver par saturation le système
10 enzymatique de correction des mésappariements de l'organisme, et un oligonucléotide consistant dans la séquence d'ADN rétablie telle qu'avant mutation du gène.

Selon ce procédé, il est possible d'obtenir des changements génétiques ciblés avec des oligonucléotides de synthèse en les introduisant
15 en grande quantité dans des cellules pendant une période d'inactivation fonctionnelle du système de réparation des mésappariements.

D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre.

20 **EXEMPLE 1** CONJUGAISON DE SOUCHES *E. coli* Hfr et *Salmonella* thyphimurim F⁻

On a réalisé des conjugaisons entre Hfr sauvages d'*E. Coli* et F⁻ de *Salmonella Thyphimurium* défectives dans les systèmes de restriction
25 du DNA, et de surcroît défectives pour les systèmes de réparation des mésappariements (mutants mutL, mutS, mutH ou MutU).

La souche Hfr de *E. Coli* a son origine de transfert à 76,5 minutes sur la carte et xylose est le marqueur injecté en premier (78'). Les souches F⁻ de *Salmonella* possèdent deux auxotrophies (met A et met
30 E) et une incapacité à utiliser le xylose (xyl⁻) ; elles sont résistantes à la streptomycine. La souche Hfr de *E. Coli* est sauvage pour ces marqueurs et sensible à la streptomycine ; elle possède deux autres auxotrophies (leucine

et thréonine) ce qui permet une triple contresélection lors des conjugaisons. Les souches Hfr de *E. Coli* et F⁻ *Salmonella* mut⁺, mutL, mutS, mutH ou mutU défectives pour les systèmes de restriction sont cultivées en milieu liquide riche (LB). Lorsqu'elles sont en phase exponentielle (1 à 5 10⁸/ml), on mélange 1 ml de Hfr et 1 ml de F⁻ et on filtre immédiatement le mélange sur filtre millipore. Ce filtre est mis à incuber à 37°C sur une boîte de milieu riche préchauffée. On laisse la conjugaison se faire pendant 40 minutes et le filtre est récupéré et mis dans 1 ml de MgSO₄ 10⁻²M puis vortexé vigoureusement pendant 1 minute pour resuspendre les bactéries et séparer les conjugants. Les aliquots sont étalés sur des boîtes de milieu sélectif : milieu minimum 63 (réf. : Miller J.H. 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, N.Y.) avec glucose (0,4 %) et sans méthionine pour sélectionner les met⁺ ou avec xylose pour seul sucre (0,4 %) et avec méthionine (100 µg/ml) pour sélectionner les xyl⁺. Ces deux milieux sélectifs ne contiennent ni thréonine ni leucine mais contiennent de la streptomycine (25 µg/ml) pour assurer une triple contre sélection des Hfr. Les boîtes sont incubées à 37°C 40 heures, 60 heures et 88 heures et les clones recombinés comptés et étudiés. Une expérience témoin correspondant au croisement homo-spécifique Hfr *Coli* x F⁻ *Coli* est réalisée dans les mêmes conditions.

De surcroît, les souches F⁻ de *Salmonella* ont été rendues mutantes pour recA (la protéine recA est indispensable à toute recombinaison homologue).

Les résultats obtenus pour les souches mutL et mutS pour lesquelles l'effet est le plus important sont décrit dans le tableau I ci-dessous. Ce tableau indique la fréquence des réceptrices F⁻ devenues xyl⁺ par bactérie Hfr donneuse après soustraction des révertants obtenus avec les souches réceptrices seules (incubation 60 heures). Des résultats équivalents ont été obtenus pour le marqueur met.

Tableau 1

Conjugaisons	Frequence xyl^+/Hfr donneuse
<u>Coli</u> Hfr + <u>Coli</u> F^-	$1.3 \cdot 10^{-1}$
<u>Coli</u> Hfr + <u>Sal.</u> $mut^+ F^-$	$6.7 \cdot 10^{-7}$
<u>Coli</u> Hfr + <u>Sal.</u> $mutL F^-$	$2.1 \cdot 10^{-3}$
<u>Coli</u> Hfr + <u>Sal.</u> $mutS F^-$	$1.7 \cdot 10^{-3}$
<u>Coli</u> Hfr + <u>Sal.</u> $mut^+ recA F^-$	$4.3 \cdot 10^{-8}$
<u>Coli</u> Hfr + <u>Sal.</u> $mutL recA F^-$	$1.8 \cdot 10^{-8}$
<u>Coli</u> Hfr + <u>Sal.</u> $mutS recA F^-$	$6 \cdot 10^{-8}$

La fréquence de recombinaison intergénériques augmente d'un facteur d'au moins 10^4 pour $mutL$ et $mutS$, et légèrement plus faible pour $mut H$ et U par rapport aux conjugaisons faites avec *Salmonellas* F^- défectives pour la restriction du DNA mais sauvages pour les gènes de réparation des mésappariements (mut^+). Par sélection de recombinants sur milieux sélectifs, nous avons pu obtenir ces hybrides entre *E. Coli* et *Salmonella* *Thyphimurium* qui, nous le pensons, sont des espèces nouvelles "Eschenella" ou "Salmorichia" avec de nouvelles combinaisons de gènes et des gènes recombinés nouveaux.

Une souche de *S. thyphimurium* $mutL$ utilisée dans l'exemple et dénommée SL 4213 $mut L$ a été déposée.

Un recombiné intergénérique *E. coli* Hfr/Sal $mutLF^-$: SCL17 a également été déposé.

EXEMPLE 2 INACTIVATION PAR SATURATION TRANSITOIRE DU SYSTEME DE REPARATION DES MESAPARIEMENTS

Chez *E. coli*, le système de correction des erreurs Mut (H, L, S, U) est limité et peut être saturé par la titration c'est-à-dire l'inactivation fonctionnelle de la protéine $MutL$.

La souche qui est la plus forte mutatrice connue E. coli mutD5 est déficiente en lecture de correction exonucléasique associée à la DNA polymérase III, donc elle produit beaucoup d'erreurs de réplication.

On a démontré par la transfection avec un DNA hétéroduplex des phages ϕ X 174 ou λ que, en pleine croissance, en milieu riche, ces bactéries sont déficientes en réparation des mésappariements. Mais si l'on arrête la réplication du DNA bactérien (phase stationnaire ou arrêt spécifique de la réplication par une mutation thermosensible) l'activité réparatrice est récupérée totalement. Cette réparation est bloquée si l'on bloque la synthèse protéique de novo par le chloramphénicol. Donc, le système Mut n'est pas seulement saturé mais "mort" et il faut resynthétiser les enzymes ou l'enzyme de réparation.

Un test de réparation des mésappariements in vivo utilise comme substrat des molécules déterminées construites in vitro par la séparation des brins de l'ADN et la reconstitution de duplexes nouveaux du type hétéroduplexes. En utilisant des gènes mutants déterminés quant à leur séquence, il est possible de construire des molécules avec un seul mésappariement déterminé. Nous avons employé un gène mutant dans le gène *ci* codant pour le répresseur du bactériophage lambda, la protéine responsable de l'état "dormant" prophagique du bactériophage lambda, qui donne un phénotype "clair" à la plaque de lyse par rapport aux plaques "troubles" du phage sauvage. Il s'agit de la mutation UV23 correspondant à une mutation G:C qui donne A:T au niveau de la quarante troisième paire de bases du gène *ci*. Donc en fonction du brin choisi, nous avons construit le DNA du phage lambda avec un brin sauvage et un brin portant la mutation UV23, le duplex est, sinon, normal sur environ 50 000 paires de bases, excepté le mésappariement G:T ou A:C au niveau de la mutation UV23. La préparation des stocks du phage lambda et la séparation des brins dans le gradient de chlorure de césium en présence des polymères poly (U,G) (uridine et guanosine) a été décrit par M. Meselson et R. Yuan (1968) Nature, 217 : 1110-1114.

Comme le système de correction des mésappariements est dirigé par la méthylation (6-méthyl-adénine) des séquences 5'GATC (Radman et Wagner (1988) Scientific American Août 1988 pour la Science, Octobre 1988), nous avons construit un ADN hétéroduplex portant la méthylation sur un seul brin. L'ADN est introduit en une seule copie dans la bactérie *E. coli* rendue perméable à l'ADN externe par la méthode du chlorure de calcium (Mandel et Miga (1970) J. Mol. Biol. 53 : 159-162 (les bactéries en croissance exponentielle sont tenues en présence de 0,1 M CaCl_2 dans la glace, pendant 2,5 heures au moins)). Les bactéries transfectées sont étalées avec la gélose molle sur les boîtes de Petri, incubées pendant la nuit et la descendance phagique de chaque molécule hétéroduplex dans les centres infectieux, est déterminée par le ré-étalement des phages repiqués de chaque centre infectieux. Trois types de centres infectieux sont possibles : pur trouble (c^+), pur clair (c), et mixtes contenant les phages c^+ et c . Les centres infectieux mixtes contiennent la descendance d'un ADN hétéroduplex non réparé : les deux brins, un c^+ , l'autre c , se sont repliqués et ont donné la descendance phagique avant qu'une réparation ait pu éliminer une base mésappariée portant le caractère c^+ ou c . Donc, un nombre important de centres infectieux mixtes signifie qu'il y a eu peu de réparation et vice versa. En outre la réparation dirigée produit les centres infectieux purs du type porté par le brin méthylé et il y a donc une incidence dans le rapport c/c^+ (voir tableau 1 ci-après)

Cette méthodologie a été décrite dans Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 503-505 (1985) par Dohet Wagner et Radman.

Le tableau 1 ci-après montre que dans une souche mutatrice mutD5, défectueuse en fidélité de la synthèse de l'ADN produisant donc beaucoup de mésappariements au cours de la réplication de son ADN, la réparation des mésappariements est déficiente.

Tableau 1 : Analyse génétique de la descendance phagique des molécules hétéroduplexes du bactériophage lambda hémiméthylées dans les diverses souches et conditions de croissance

Souche d' <i>E. coli</i>	condition de la culture	Hétéroduplex : $C^+ - G - (r) me^-$ $C - T - (l) me^+$ Descendance : $c^+ \quad c/c^+ \quad c \quad (\%)$		
W 3110 (mut ⁺)	32°	0	4	96
	42°	1	4	95
C ₆₀₀ (mutL)	32°	1	86	13
	42	1	92	7
W 3110 dna A (ts)	32°	0	3	97
	42°	0	3	97
KD 1079 (mut D5)	32°	0	48	52
	42	1	49	50
KD 1079 dna A (ts) mut D5	32°	1	48	51
	42°	0	10	90

En comparant les 3 % de centre infectieux mixtes de la bactérie W 3110 dna Ats avec les 48 et 49 % des centres infectieux mixtes chez la bactérie mutD5, il apparaît bien que la réparation des mésappariements est déficiente chez la mutatrice mutD5. En comparant les 49 % de centres infectieux mixtes avec les 86 à 92 % chez le mutant mutL, il apparaît que le défaut en réparation des mésappariements n'est pas total. L'arrêt d'initiation de la réplication de l'ADN bactérien chez les mutants dna Ats à 42°C pendant 2 heures, n'a pas affecté la réparation des mésappariements chez les souches autres que mutD5, dna Ats où on a pu observer la récupération de la réparation des mésappariements avec 10 % de centre infectieux mixtes. Cette récupération n'a pas eu lieu en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique, soit avec 100 µg/ml de chloramphenicol. Donc, en arrêtant la production des mésappariements par la réplication erronée, on ne retrouve la réparation que par la synthèse des protéines. Ceci suggère que la réparation des mésappariements implique un "suicide" enzymatique. La saturation correspondrait alors à une inactivation fonctionnelle d'une ou plusieurs protéines Mut. Dans les expériences décrites ci-après nous montrons que la protéine fonctionnelle manquante est la protéine Mut L.

a) préparation de l'hétéroduplex circulaire du phage M13 mp2

L'ADN phagique et l'ADN intracellulaire sont préparés par centrifugation CsCl en présence de bromure d'éthidium comme décrit par Brooks et al. (1988) à partir du phage purifié ou après infection par les phages et incubation pendant 30 minutes. Il s'agit de méthodes standards décrites par Maniatis, Fritsch et Sambrook (1982) Molecular Cloning, Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. L'hétéroduplex est préparé en hybridant le brin d'ADN intracellulaire à double brin (RFI) linéarisé avec l'enzyme Ava II, dénaturé 10 minutes à 70°C dans l'eau, puis renaturé en présence de l'ADN simple brin pendant 10 minutes à 60°C dans le tampon 2x SSC.

L'ADN simple brin est éliminé par la cellulose-benzoylée-naphtalylée en présence de NaCl 0,1 M. L'ADN hétéroduplex avec un mésappariement G:T est gardé dans le tampon Tris 0,05 M et EDTA 0,001 M à pH 8.

5 Le mésappariement G:T porte son marquage génétique :

5' — GTT — 3' (-) bleue (lac⁺) méthyl⁻

5' — TAA — 3' (+) blanc (lac⁻) méthyl⁺

10 Comme précédemment avec l'ADN du phage lambda, une seule molécule entre dans la cellule rendue perméable par la méthode Hanahan (Maniatis et Coll. 1982), basé sur l'effet du calcium dithiothréitol et diméthylsulfoxyde sur les parois cellulaires. Les bactéries transfectées sont diluées et étalées avec la souche indicatrice CSH 50 (del lac-pro, ara⁻, pro⁻, str A) en présence de X-gal et IPTG pour permettre la coloration bleue des plaques phagiques lac⁺ et non celle des phages lac⁻ (mutants). Les plages de lyses mixtes (blanc/bleu) montrent l'hétéroduplex non réparé.

15 Le tableau 2 ci-après montre qu'en phase logarithmique de croissance, la fraction des centres infectieux mixtes est semblable chez le mutant mutL déficient en réparation et le mutant mutD. Mais en phase tardive logarithmique avant la phase stationnaire, la fraction des centres infectieux mixtes chez le mutant mutD est la même que chez le type sauvage mut⁺. donc, la mutatrice mutD est déficiente en réparation des mésappariements pendant la croissance rapide mais elle retrouve son activité de réparation lorsque la croissance ralentit.

25

30

Tableau 2 : Descendance phagique des molécules hétéroduplexes du bactériophage M13 mp2 (hétéroduplex avec mésappariement G:T) dans les souches mutatrices. Effet de la phase de croissance.

Souche d'E. coli	<u>nature et pourcentage des centres infectieux</u>							
	<u>phase log. précoce</u>				<u>phase log. tardive</u>			
	mixtes	blancs	bleus	total	mixtes	blancs	bleus	total
KA 796 (mut ⁺)	0,5	92	7,5	1120	6,9	76	17,1	1290
NR 9163 (mutL)	50,6	7,9	41,5	860	47,8	6,6	45,6	1603
NR 9066 (mutD)	40,7	22	37,3	1013	7,5	69,8	22,5	1949

Le tableau 3 ci-après montre que les gènes clonés et surexprimés peuvent récupérer l'activité de réparation des mésappariements dans la souche mutD. Spécifiquement, les gènes mutL et mutH et non les gènes mutS et mutU clonés dans le plasmide pBR325 introduits dans la souche mutD, provoquent la récupération quasi totale de l'activité de réparation. En accord avec cette observation, la fréquence des mutations spontanées décroît dans la mutatrice mutD portant le plasmide pBR325

(mutL⁺) ou pBR325 (mutH⁺) et non avec les pBR325 (mutS⁺) ou pBR325 (mutU⁺) comme il ressort du tableau 4 ci-après.

Tableau 3 : Descendance phagique des molécules hétéroduplexes (mésapariement G:T) du phage M13 mp2 dans la souche mutatrice mutD5 portant les plasmides avec les gènes mutH, mutL, mutS et mutU

Souches d'E. coli	Nature et pourcentage des centres infectieux			
	mixtes	blancs	bleus	total
NR 9066 mutD5				
- sans pBR	47,8	17,7	34,4	661
+ pBR (mutH ⁺)	6,0	77,6	16,4	1756
+ pBR (mutL ⁺)	1,3	73,3	26,2	872
+ pBR (mutS ⁺)	49,8	14,1	36,0	1186
+ pBR (mutU ⁺)	39,7	18,5	41,6	867
Segregant (mutL ⁻)	55,0	11,6	33,4	1161
KA 796 (mut ⁺)	2,6	80,3	16,9	1778
NR 9163 (mutL ⁻)	48,2	6,2	45,5	1811

Tableau 4 : Fréquences des mutations spontanées dans mutD5 portant les plasmides pBR325 (mutH, mutL, mutS ou mutU)

Souches d' <i>E. coli</i>	Fréquence des mutations ($\times 10^{-6}$)	
	Rif ^R	Nal ^R
NR 9066 mutD5		
- sans pBR	215,0	60,3
+ pBR (mutH ⁺)	42,4	8,7
+ pBR (mutL ⁺)	15,3	0,71
+ pBR (mutS ⁺)	149,0	37,3
+ pBR (mutU ⁺)	165,0	36,4
Segregant Amp ^S (mutL ⁻)	245,0	55,1
KA 796 (mut ⁺)	0,006	0,0008

Ces expériences présentent la première démonstration expérimentale d'une catastrophe d'erreurs ou d'effet avalanche. Un excès d'erreurs au niveau de la synthèse de l'ADN provoque la saturation (l'inactivation) du système de réparation des mésappariements. Le résultat est un défaut double dans les systèmes de la fidélité de réplication.

En introduisant les plasmides mutH⁺, mutL⁺, mutS⁺ et mutU⁺ dans *E. coli* mutD5, on peut démontrer qu'il n'y a pas de perte d'activité de réparation quand la fonction MutL est surproduite. Donc, la protéine MutL se "suicide" dans l'acte de réparation. La mutatrice mutD5 présente le premier cas expérimental de "catastrophe d'erreurs" : trop d'erreurs au niveau de la réplication du DNA qui surcharge le système de correction lequel s'effondre et provoque un effet d'"avalanche".

Donc, il suffit d'introduire d'un coup un nombre excessif de mésappariements de base dans une cellule pour que le système de réparation s'effondre et reste inactif jusqu'à la "dilution" du substrat avec les mésappariements et la resynthèse des enzymes Mut.

EXEMPLE 3 SATURATION DU SYSTEME DE CORRECTION DES MESAPPARIEMENTS CHEZ LES CELLULES DES MAMMI- FERES

Il est difficile d'isoler un mutant mut- chez les cellules de mammifères. Il s'agit de mutations récessives dans des cellules diploïdes qui nécessitent l'inactivation simultanée de deux copies du même gène. Ces mutants peuvent en outre être létaux. Ceci est dû au fait que le polymorphisme des séquences, surtout au niveau des diverses familles de séquences répétitives, est l'élément clé de la stabilité chromosomique. C'est en effet grâce à ce polymorphisme que le système de réparation des mésappariements peut empêcher toute recombinaison dangereuse entre les séquences répétitives (aberrations chromosomiques) ou entre les chromosomes homologues (homozygotie par recombinaison mitotique), sauf la recombinaison réparatrice entre les chromatides soeurs (échange de chromatides soeurs) issues de la réplication d'une molécule-mère et ayant donc une séquence identique.

Trois expériences ont été tentées : suite à l'introduction dans les cellules de la souris de DNA hétéroduplex riche en mésappariements, on a cherché à déterminer si l'on pouvait :

a) observer l'apparition d'aberrations chromosomiques provoqués par l'activation de la recombinaison entre les séquences répétitives diversifiées,

b) observer l'apparition de mutations suite à des erreurs de réplication non corrigées,

c) cibler par un oligonucléotide synthétique une mutation cancérogène puis la corriger par un autre oligonucléotide.

a) On réalise la transfection des cellules CHO (Chinese Hamster ovary) et NIH3T3 (fibroblastes de la souris) par la méthode décrite par C.Chen et H. Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7 : 2745-2752 ("High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA"). Environ 50 % des cellules sont effectivement transfectées par le DNA circulaire qu'est l'hétéroduplex M13/fd dont la préparation sera explicitée ci-après et environ 10^6 des paires de bases du DNA entrent dans la cellule, donc environ 200 molécules portant environ 35 000 mésappariements.

Les plaques métaphasiques pour observer les chromosomes mitotiques condensés sont préparées d'après les méthodes classiques décrites par A.R. Kinsella et M. Radman "Inhibition of carcinogen-induced chromosomal aberrations by an anticarcinogenic protease inhibitor", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 3544-3547 et "Tumor promoter induces sister chromatid exchanges : relevance to mechanisms of carcinogenesis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75, 6149-6153.

b) Pour tester l'effet mutateur de la transfection par hétéroduplex riche en mésappariements, on mélange le DNA du plasmide pcD neo (Chen et Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7 : 2745-2752 "high efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA") avec l'hétéroduplex. Ceci permet la sélection en présence de 400 µg/ml de néomycine G418 des cellules dans lesquelles le DNA exogène a pénétré. Parmi ces cellules, on teste la fréquence des mutations de résistance à la 6-thioguanine et à l'Ouabaine comme décrit par Kinsella et Radman (1978) P.N.A.S. USA 75, 6149-6153.

c) Mutagenèse ciblée et programmée.

Pour effectuer la pénétration des oligonucléotides de synthèse on peut employer plusieurs méthodes, telles que la méthode du phosphate de calcium, l'électroporation et la méthode des liposomes comme décrite par Chen et Okayama, Andreason et Evans et Mannins et Gould-Fogente respectivement dans Biotechniques, vol 6, n° 7, Juillet/Août 1988). La technique par microinjection directement dans le noyau peut également être pratiquée.

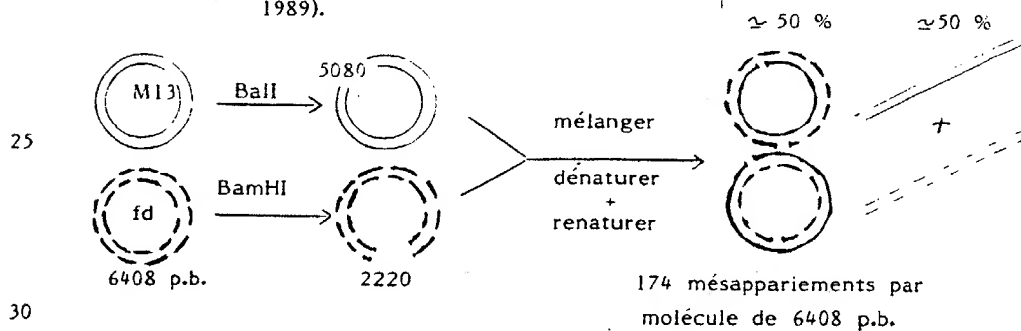
On utilise des cellules NIH3T3 de la souris pour la transformation et l'hétéroduplexe M13/fd dont la préparation est explicitée ci-après comme inactivateur du système de correction des mésappariements ainsi que l'oligonucléotide de synthèse 19-mer 5' GTTGGAGCTTGTGGCGTAG (le T souligné est la base "muté" dans beaucoup de tumeurs humaines et de rongeurs qui se trouve dans le codon 12 de l'oncogène K-ras). Le caractère cancérogène de la cellule transformée se voit par la croissance en "foyer" sur le tapis monocouche ou par la croissance dans la gélose molle. Par mutagenèse reverse avec l'oligonucléotide 5' GTTGGAGCTTGTGGCGTAG, on peut obtenir une guérison génétique.

Préparation de l'hétéroduplexe M13/fd et hétéroduplexes divers

On a réalisé un hétéroduplex comportant 3 % de mésappariements entre les DNAs des phages bactériens M13 et fd.

Le principe opératoire est le suivant :

- isoler le DNA intracellulaire (circulaire, double brin ou RFI),
- cliver chaque population moléculaire une fois mais à différents endroits de la molécule,
- dénaturer - renaturer,
- isoler le DNA circulaire (comme décrit par Brooks et al., 1989).



(Les séquences : Van Wezenbeek et Coll. (1980) Gene, 11 : 129-148)

Les cultures de bactéries, infections phagiques, isolement de la forme répliquative (RFI) des bactériophages M13 ou fd ont été décrits par Messing dans Methods in enzymology vol. 101, p 20-78 (1983).

La forme I (RFI) est coupée pour le phage M13 par Ball et pour le phage fd par BamHI. Après digestion enzymatique, les ADN sont dénaturés puis renaturés selon le protocole décrit par Lee, Clark et Modrich PNAS 80 4639-4643 (1983). Après action de la ligase d'E. coli, l'ADN circulaire clos par liaison covalente est purifié par centrifugation en CsCl-EtdBr.

On a également réalisé un hétéroduplex comportant 30 % de mésappariements entre les DNA des phages OX 174 et G4 selon le même procédé.

On a également réalisé un hétéroduplex à 20 % de mésappariements à partir des DNA des bactéries Escherichia coli et Salmonella typhimurium. On a isolé le DNA chromosomique en mélangeant dans un rapport 1 : 1 puis dénaturé et renaturé, dégradé les extrémités simple brin avec l'endonucléase S1.

Les souches suivantes ont été déposées à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15.

Salmonella typhimurium SL4213 mut L N° I 831.

Recombinant Intergénérique SCL17 N° I 832.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 MARINUS M. et MORRIS N. (1973) J. Bacteriol 114 1143-1150.
- 5 2 TIRABY G. et SICARD A. (1973) J. Bacteriol 116 1130-1135.
- 3 WILLIAMSON et al. (1965) Genetics 110 609-646.
- 4 Ochman et Wilson dans E. coli et Salmonella thyphimurium Vol. 2
10 American Society for Microbiology Washington DC pp. 1649-1654.
- 5 BARON et al. (1959) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45 976-984.
- 6 EISENSTARK (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54 117-120.
- 15 7 MERGEAY et GERITS (1983) J. Gen. Microbiol 129 321-335.
- 8 P. BROOKS et al. accepté à Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
- 20 9 Maniatis et coll. (1982) Molecules Cloning Cold Spring Harbor
Laboratory.

25

30

REVENDICATIONS

1. Procédé de recombinaison in vivo de séquences d'ADN partiellement homologues présentant jusqu'à 30 % de mésappariements de base, caractérisé en ce qu'on met en présence lesdites séquences dans des cellules ou un organisme dont le système enzymatique de réparation des mésappariements est défectueux ou a été inactivé transitoirement, notamment par saturation, le temps d'obtenir la recombinaison entre lesdites séquences d'ADN.
2. Procédé de production in vivo de gènes hybrides et de leurs protéines codées, caractérisé en ce que dans un procédé selon la revendication 1 on met en présence dans ledit organisme défectueux ou inactivé dans le système enzymatique de réparation des mésappariements, deux dites séquences d'ADN consistant en des gènes partiellement homologues issus de deux organismes différents, et on sélectionne le gène hybride recherché ou sa protéine codée.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on utilise une souche de E. coli $\text{mutS}^{\text{ts-1}}$ thermosensible pour la fonction de réparation des mésappariements de bases, souche qui est mutatrice mutS^- à 42°C et normale mut^+ à 32°C.
4. Procédé de production de cellules recombinées par des techniques de transformation ou fusion selon la revendication 1, caractérisé en ce que :
- on effectue la transformation et la recombinaison in vivo :
 - . à l'aide de l'ADN de cellules d'un organisme d'une première espèce et/ou d'un premier genre, et
 - . avec l'ADN chromosomique des cellules d'un organisme d'une deuxième espèce et/ou d'un deuxième genre,

ces cellules de l'organisme de deuxième espèce ou genre étant défectueuses dans le système enzymatique de réparation des mésappariements de bases ou ayant ledit système inactivé transitoirement, notamment par saturation, ou bien

- 5 - on effectue la fusion in vivo des chromosomes de ces deux types de cellules ayant toutes deux un système enzymatique de réparation des mésappariements défectueux ou ayant ledit système inactivé transitoirement notamment par saturation.

- 10 5. Procédé de production d'organismes recombinés par croisement et recombinaison in vivo d'organismes d'espèces et/ou de genres différents selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on effectue le croisement in vivo entre :

- 15 - un organisme d'une première espèce et/ou d'un premier genre, et
- un organisme d'une deuxième espèce et/ou d'un deuxième genre,

l'un au moins de ces deux organismes étant défectueux dans le système enzymatique de réparation des mésappariements de bases ou ayant ledit système inactivé transitoirement, notamment par saturation.

- 20 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'on produit des bactéries, des levures, des cellules de plantes ou animales recombinées à partir d'organismes correspondants.

- 25 7. Procédé de production de bactéries recombinées par croisement et recombinaison in vivo de bactéries d'espèces et/ou de genres différents selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on effectue une conjugaison in vivo entre

- 30 - des bactéries dites réceptrices d'un organisme d'une première espèce et/ou d'un premier genre qui sont défectueuses dans les systèmes enzymatiques de réparation des mésappariements de base ou dont les systèmes enzymatiques de réparation des mésappariements des bases sont inactivés transitoirement notamment par saturation le temps d'obtenir la recombinaison voulue, et

- des bactéries dites donneuses d'un organisme d'une deuxième espèce et/ou deuxième genre qui comporte un caractère particulier que l'on souhaite transférer aux bactéries réceptrices.

5 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les bactéries dites réceptrices sont en outre défectives dans le système enzymatique de restriction de l'ADN.

10 9. Procédé de production in vivo de gènes hybrides et de leurs protéines codées à partir de deux gènes partiellement homologues, caractérisé en ce que dans un procédé selon la revendication 5 un premier organisme contient un premier gène et ledit deuxième organisme contient le second gène partiellement homologue, et en ce qu'on sélectionne le gène hybride recherché ou sa protéine codée.

15 10. Procédé selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce qu'on croise une souche E. Coli et une souche Salmonella thyphimurium dont l'une au moins est défectueuse ou inactivée transitoirement dans le système enzymatique de réparation des mésappariements.

20 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la souche E. coli ou Salmonella thyphimurium défectueuse dans le système enzymatique de réparation des mésappariements de base est une souche $mutS^-$ ou $mutL^-$, c'est-à-dire défectueuse en protéine MutS ou MutL qui interviennent dans la reconnaissance des mésappariements.

25 12. Procédé selon l'une des revendications 7 à 11, caractérisé en ce que la bactérie donneuse est une souche HFr, la bactérie réceptrice est une souche mutante F^- .

30 13. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la saturation du système enzymatique de réparation des mésappariements de base se fait en introduisant un hétéroduplex riche en mésappariement.

14. Procédé de mutagenèse inverse ciblée d'un gène dans un organisme selon la revendication 1, ledit gène comportant une base mutée que l'on veut rétablir telle qu'avant sa mutation, caractérisé en ce qu'on introduit dans l'organisme un hétéroduplex comportant un nombre élevé de mésappariement pour inactiver par saturation le système enzymatique de correction des mésappariements de l'organisme et un oligonucléotide consistant dans la séquence d'ADN rétablie telle qu'avant mutation du gène.

15. Procédé selon les revendications 13 ou 14, caractérisé en ce que l'hétéroduplex provient des phages M13 et fd.

